

SPEZIESSPEZIFISCHE SERODIAGNOSE VON
SARCOCYSTIS MURIS UND S.DISPERSA-INFEKTIONEN
DER MAUS MITTELS ISOELEKTRISCHER FOKUSSIERUNG
UND IMMUNOBLOTTING

ARMIN MAREIS

*Diss.
München
1985*



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Aus dem Institut für
Vergleichende Tropenmedizin und Parasitologie
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Vorstand: Prof. Dr. R. Gothe

Speziesspezifische Serodiagnose von
Sarcocystis muris und *S. dispersa*-Infektionen der Maus
mittels isoelektrischer Fokussierung und Immunoblotting

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

von
Armin Mareis
aus
Kaisheim

München 1985

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Universität München

Dekan : Prof. Dr. W. Leidl

Referent : Prof. Dr. Dr.h.c. J. Boch

Korreferent : Prof. Dr. M. Merckenschlager

Tag der Promotion : 22. Februar 1985

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
I. Einleitung	1
II. Biologie, Zwischenwirtsreaktionen auf wiederholten Kontakt sowie immunologische Eigenschaften von Antigenaufbereitungen der Sarkosporidien (anhand der Literatur)	2
III. Eigene Untersuchungen	14
A. Material und Methoden	14
B. Ergebnisse	21
1. Antigendifferenzierung auf Grund der Proteinmuster	22
2. Reaktionen der fraktionierten Antigene..	25
a. Mit Hochimmunseren	25
b. Mit Seren infizierter Mäuse	27
3. Reaktionen isolierter Antigenfraktionen im ELISA	28
IV. Besprechung der Ergebnisse	35
V. Zusammenfassung	40
Summary	41
VI. Literaturverzeichnis	42

Lebenslauf

1. The first of the three main branches of the subject is the study of the history of the subject.
2. The second of the three main branches of the subject is the study of the theory of the subject.
3. The third of the three main branches of the subject is the study of the practice of the subject.
4. The fourth of the three main branches of the subject is the study of the application of the subject.
5. The fifth of the three main branches of the subject is the study of the development of the subject.
6. The sixth of the three main branches of the subject is the study of the future of the subject.
7. The seventh of the three main branches of the subject is the study of the present of the subject.
8. The eighth of the three main branches of the subject is the study of the past of the subject.
9. The ninth of the three main branches of the subject is the study of the future of the subject.
10. The tenth of the three main branches of the subject is the study of the present of the subject.
11. The eleventh of the three main branches of the subject is the study of the past of the subject.
12. The twelfth of the three main branches of the subject is the study of the future of the subject.
13. The thirteenth of the three main branches of the subject is the study of the present of the subject.
14. The fourteenth of the three main branches of the subject is the study of the past of the subject.
15. The fifteenth of the three main branches of the subject is the study of the future of the subject.
16. The sixteenth of the three main branches of the subject is the study of the present of the subject.
17. The seventeenth of the three main branches of the subject is the study of the past of the subject.
18. The eighteenth of the three main branches of the subject is the study of the future of the subject.
19. The nineteenth of the three main branches of the subject is the study of the present of the subject.
20. The twentieth of the three main branches of the subject is the study of the past of the subject.

I. EINLEITUNG

Die Bedeutung der Sarkosporidien liegt in den wirtschaftlichen Verlusten, die sie der Nutztierhaltung zufügen.

Ihre Verbreitung basiert auf einem obligaten Wechsel zwischen Endwirt und Zwischenwirt. Daher bietet sich als wirkungsvollste Maßnahme das Unterbinden der Übertragung an. Erschwerend wirkt dabei die Tatsache, daß jede Nutztierart für mehrere Sarkosporidienspezies mit jeweils unterschiedlichen Endwirten empfänglich ist. Dieser Umstand erfordert die Identifizierung der einzelnen *Sarcocystis*-Art. Bisher ist dies beim Zwischenwirt nur durch eine mikroskopische Untersuchung von Biopsie- und Sektionsmaterial möglich.

Ziel dieser Arbeit war es, am Beispiel von *Sarcocystis muris* und *S. dispersa* zu untersuchen, ob eine Antigenauftrennung mittels Elektrofokussierung und nachfolgendem Enzyme Immuno Assay die Artendifferenzierung auf serologischem Wege ermöglicht.

II. BIOLOGIE, ZWISCHENWIRTSREAKTIONEN AUF WIEDERHOLTEN KONTAKT SOWIE IMMUNOLOGISCHE EIGENSCHAFTEN VON ANTIGEN-AUFBEREITUNGEN DER SARKOSPORIDIEN (anhand der Literatur)

Sarcocystis muris und *S. dispersa* sind, wie alle Sarkosporidien, obligat zweiwirtige, zystenbildende Kokzidien. Ihre Entwicklung wurde von RUIZ und FRENKEL (1976) sowie von CERNA (1976, 1977) aufgeklärt.

Für *Sarcocystis muris* (BLANCHARD, 1885) LABBÉ, 1899 sind Katze und Frettchen Endwirte. Im Zwischenwirt Maus läuft zwischen dem 11. und 17. Tag p.i. in den Leberparenchymzellen die Schizogonie ab (RUIZ und FRENKEL, 1976). Muskelzysten lassen sich erstmals am 28. Infektionstag nachweisen. Zystozoiten beobachtete HOFER (1981) erstmals am 45. Tag p.i. Makroskopisch sind die Zysten vom 90. Tag an sichtbar; allerdings treten mikroskopisch bereits ab dem 69. Tag degenerative Prozesse auf (HOFER, 1981).

Sarcocystis dispersa (CERNA, 1976) wurde bisher bei der Schleier- und Waldohreule festgestellt, die schon 9 Tage nach experimenteller Infektion Sporozysten ausscheiden. Die Schizogonie im Zwischenwirt Maus läuft vom 4. bis 6. Tag p.i. ab (CERNA, 1977). Mikroskopisch lassen sich erstmals Zysten am 15. Tag p.i. (SCHÖLLER, 1982), Zystozoiten am 29. Tag p.i. feststellen. HOFER (1981) wies makroskopische Zysten ab dem 70., Degenerationserscheinungen ab dem 90. Tag nach.

Zahlreich durchgeführte Reinfektionsversuche belegen, daß Sarkosporidien im Zwischenwirt immunisierend wirken.

Mäuse, die je 1000 *S. muris*-Sporozysten erhalten hatten, superinfizierte HOFER (1981) 30 Tage später mit der glei-

chen Dosis. Unabhängig von der Erstdosis ging diese Infektion bei allen Tieren an. Eine Zweitinfektion nach 60 Tagen ging zwar auch durchweg an, jedoch mit signifikant niedrigerer Zystenzahl. Nach 90, 120 und 150 Tagen durchgeführte Inokulationen blieben ohne Erfolg. Drittinfektion 78 Tage nach der Erst- und 48 Tage nach der Zweitinfektion führte nur bei einem Teil der Mäuse zur Bildung weiterer Zysten, jedoch dann in deutlich geringerer Zahl als bei Kontrollen. Dagegen ergab eine heterologe Zweitinfektion mit *S.dispersa* 150 Tage p.i. ähnliche Zystenzahlen wie bei den Vergleichstieren. Eine weitere Gruppe erhielt 4 Wochen lang 2x wöchentlich je Tier 50 *S.muris*-Sporozysten; hier gingen fast alle Infektionen an.

Homologe Reinokulationen mit je 1000 *S.dispersa*-Sporozysten 100 Tage nach der Erstinfektion hafteten in keinem Fall; auch wurde dadurch die Zystenzahl aus der Erstinfektion nicht beeinflusst. Heterologe Zweitinfektionen mit 1000 *S.muris*-Sporozysten zum gleichen Zeitpunkt waren dagegen immer erfolgreich.

Gleichgültig ob homolog oder heterolog, wiederholte Inokulationen beeinflussten niemals die im ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) und in der IHA (Indirekte Hämagglutination) nachweisbaren Antikörpertiter (HOFER, 1981). Diese Befunde stehen im Einklang mit Ergebnissen von KEPPER (1981), die den Titerverlauf nach *S.muris*-Infektionen mit Hilfe des IFAT (Indirekter Fluoreszenzantikörper-Test) untersuchte.

RUIZ und FRENKEL (1976) berichten von gelungenen Superinfektionen mit *S.muris*, nennen aber keinen Zeitpunkt.

Einen Tag alte, mit 1000 *S.dispersa*-Sporozysten infizierte Mäuse wurden von GUT und CERNA (1980) 26 Tage später mit 80000 Sporozysten superinfiziert; dabei wiesen nach 28 bis 43 Tagen alle Tiere massiven Zystenbefall auf.

LEIER (1982) untersuchte die immunisierende Wirkung bestrahlter *S.muris*-Sporozysten und setzte zu verschiedenen Zeiten Belastungsinfektionen. Für eine Belastung mit je 1000 unbestrahlten Sporozysten am 40. Tag p.i. erwiesen sich 10 krad als wirksamste Bestrahlungsdosis; 11 von 20 Mäusen waren zwar immun, zeigten allerdings in der IHA keine Titer. Der Autor nimmt daher ausschließlich zelluläre Abwehrmechanismen an. Bei Dosen unter 10 krad gingen sowohl Erst- als auch Belastungsinfektion, über 10 krad nur die Zweitinfektion an. 5 krad waren am effektivsten gegen Belastung am 91. und 105. Tag; alle Mäuse dieser Gruppe waren immun und wiesen Titer auf. Je höher die Bestrahlungsdosis, desto größer waren die Angehensraten der Belastungsinfektion und umso niedriger die Antikörpertiter.

Nach ERBER und GEISEL (1979) hatten Schweine nach einer homologen Zweitinokulation von *S.suicanis* 3 Wochen lang erhöhte Temperaturen. Auf eine dritte und vierte (3 Mill. Sporozysten) Inokulation reagierten die Tiere nicht mehr; auch wiesen sie Zysten nur aus der Erstinfektion auf. Dagegen erbrachte eine fünfte, diesmal heterologe Infektion mit *S.suihominis* zweigipfliges Fieber. ZIELASKO und Mitarb. (1981) verabfolgten 4 Schweinen je 10 *S.suicanis*-Sporozysten; eine Belastungsinfektion mit je 9 Mill. Sporozysten überlebte nur eines der Tiere. Dagegen traten in einer mit je 1000 Sporozysten immunisierten Gruppe keine Verluste auf. Ebenso überstanden 3 mit 40000, 80000 und

120000 Sporozysten infizierte Schweine eine von NEUMAYER (1982) 56 Tage später gesetzte homologe Belastung durch 500000 und 1,2 Mill. Sporozysten.

Mit je 1000 *S.suicanis*-Sporozysten von WEYRETER und WEBER (1982) immunisierte Schweine trotzten einer Belastungsinfektion mit 3 Mill. dieser Dauerstadien nach 40 Tagen. Erfolgte die Belastung jedoch nach 80 bzw. 120 Tagen, so starben 1 bzw. 2 von jeweils 4 Tieren; die übrigen zeigten ebenso starke Störungen des Allgemeinbefindens wie die Kontrolltiere vor ihrem Tod. Obwohl die Antikörpertiter bis zum 180. Tag kaum fielen, bestand am 160. Tag p.i. gegen eine Reinfektion keinerlei Schutzwirkung mehr.

SCHNIEDER und ROMMEL (1983) immunisierten 16 Schweine mit wöchentlich drei Gaben von je 50 *S.suicanis*-Sporozysten. 40, 80, 120 und 160 Tage nach Beginn der Immunisierung wurden je 4 dieser Schweine und je 2 Kontrolltiere mit jeweils 3 Mill. Sporozysten belastet. Von den 8 Kontrollschweinen verendeten 6 um den 12. Tag. Die immunisierten Tiere dagegen zeigten nur Temperaturerhöhungen; diese waren um so niedriger, je später die zweite Inokulation stattgefunden hatte. Die Autoren schließen daraus, daß wiederholte Infektionen mit geringen Sporozystenzahlen in der Praxis ständige Antigenreize darstellen, die zur Immunität führen und akute Sarkozystosen selten auftreten lassen.

Nach der Erfahrung von GESTRICH, HEYDORN und BAYSU (1975) stellen 2 Mill. Sporozysten von *S.bovicanis* für Kälber die letale Dosis dar. Andererseits bemerkten die Autoren, daß geringe Mengen dieser Dauerstadien eine Immunität zu

verursachen schienen. MEHLHORN, HEYDORN und GESTRICH (1975) verabreichten einem Kalb im Verlauf von 9 Wochen nach und nach 1,9 Mill. *S.bovicanis*-Sporozysten. Das Tier überlebte die Belastung mit 2 Mill. Sporozysten 70 Tage nach Immunisierungsbeginn ebenso wie ein zweites mit 100000 Sporozysten immunisiertes Kalb, das nach 42 Tagen belastet wurde. Je zwei Kälber, die mit 40000 *S.bovicanis*- bzw. 210000 *S.bovicanis*-Sporozysten infiziert worden waren, reinokulierten REITER und Mitarb. (1981) 81 Tage p.i. homolog bzw. heterolog, ohne daß eines der Tiere daraufhin Krankheiterscheinungen zeigte. Lediglich bei dem heterolog mit *S.bovicanis* infizierten Kalb erfolgte ein Titeranstieg im IFAT, ELISA und IHA. Weiterhin erwies sich ein Rind nach 60 Wochen als geschützt gegen 2 Mill. *S.bovicanis*-Sporozysten, nachdem es zuvor mit 250000 immunisiert worden war (NEDJARI, 1978).

Eine von ROSCHER (1980) bei Schaflämmern gesetzte Mischinfektion mit 5000 und 50000 Sporozysten von *S.ovicanis* und *S.spec.* ergab massenhaft Muskelzysten und deutliche klinische Symptome. Erfolgte nach 159 Tagen eine homologe (500000 Sporozysten der genannten Mischung) oder heterologe (90000 Sporozysten von *S.ovifelis*) Reinokulation, so traten weder Krankheiterscheinungen auf noch entwickelten sich Muskelzysten.

Durch Verabreichung von 50000 *S.ovicanis*-Sporozysten, die mit 20krad bestrahlt waren, gelang es LIGHTOWLERS (1979), Lämmer weitgehend zu immunisieren. Während die Kontrolltiere an Belastungsinfektionen eingingen, traten bei der behandelten Gruppe nur schwache Krankheitssymptome auf.

DUBEY (1981) ermittelte für Ziegen eine LD100 von 100000 *S.capracanis*-Sporozysten. Mit 1000 Sporozysten immunisierte Lämmer überlebten eine nach 14 Tagen gesetzte Belastung mit 100000 davon. Von zwei mit 100 Sporozysten infizierten Tieren verendete eines. Nach 30 und 60 Tagen war diese Gruppe jedoch vollständig geschützt. Die Versuche zeigten gleichzeitig, daß eine Immunisierung mit nur 10 Sporozysten nicht ausreichte, um einer tödlichen Belastungsdosis zu trotzen. DUBEY (1983) immunisierte ferner Ziegen mit 10000 *S.capracanis*-Sporozysten. Die Tiere waren im untersuchten Zeitraum von 92 bis 274 Tagen p.i. gegen weitere Infektionen geschützt; auf Inokulationen mit normalerweise tödlichen Dosen reagierten sie in der Regel nur mit Fieber. Während die Parasiten des Zweitinokulums in immunisierten Tieren anscheinend über die erste Schizogonie nicht hinaus kamen, fand ein immer stärkerer Abbau der Muskelzysten unabhängig vom Zeitpunkt der Reinokulation statt. Gegen Versuchsende (272 und 332 Tage p.i.) konnten bei einigen der immunisierten Tiere keine Zysten mehr nachgewiesen werden.

In der Serodagnostik von Sarkosporidieninfektionen hat sich eine große Zahl von Kreuzreaktionen zwischen den einzelnen Spezies ergeben. Sie traten bei allen angewandten Testmethoden, nämlich IFAT, IHA, KBR und ELISA auf. Das heterologe System lieferte des öfteren sogar die höheren Titer, was in Tabelle 1 mit + gekennzeichnet ist. Auch die Verwendung von Parasiten und deren Extrakten aus verschiedenen Entwicklungsstadien lieferte solche Kreuzreaktionen. Untersucht wurden Sporozoitenextrakt-Antigen (SZE), Zystenwandextrakt-Antigen (ZWE), Zystozoiten-Antigen (ZZ) und Zystozoitenextrakt-Antigen (ZZE).

Tabelle 1

Bestehende Infektion	verwendetes Antigen	Methode	Unterschied*	Autor (Nr.)
S.muris	S.dispersa, ZZE	ELISA	3-5	15)
	S.bovifelis, ZZ	IFAT	5-neg	17)
	S.ovifelis, ZZ	IFAT	1-2	17)
	S.ovifelis, ZZE	ELISA	0	37)
	S.singaporensis, ZZ	IFAT	2-3	17)
	S.suicanis, ZZ	IFAT	2-3	17)
	S.suicanis, ZZE	ELISA	4	37)
	S.sp.(Rötelmaus), ZZ	IFAT	3-4	17)
	S.sp.(Waldspitzmaus), ZZ	IFAT	3-neg.	17)
	S.dispersa	ELISA/IHA	2-3/pos	15)
S.suicanis	S.cernae, ZZ	IFAT	0-1	5)
	S.suihominis, ZZE	ELISA	+1-0	18)
	S.bovicanis, ZZE	ELISA	+1	18)
	S.bovifelis, ZZ	IFAT	2-4	39)
	S.bovihominis, ZZE	ELISA	+1-0	18)
	S.gracilis, SZE	ELISA	+1-0	18)
	S.muris, ZZ	IFAT	3-neg	39)
	S.muris, ZZE/ZZ	ELISA, IHA, KBR/IFAT	1-2	36)
	S.muris, ZZE	ELISA	+2-0	37)
	S.ovicanis, ZZE	ELISA	0	18)
S.suihominis	S.ovifelis, ZWE	ELISA	+2-+1	18)
	S.ovifelis, ZZE	ELISA	+2-0	18)
	S.ovifelis, ZZE	ELISA	+2-0	37)
	S.ovifelis, ZZ	IFAT	1-2	39)
	S.sp.(Rötelmaus), ZZ	IFAT	4-neg	39)
	S.sp.(Waldspitzmaus), ZZ	IFAT	neg	39)
	S.suicanis, SZE	ELISA	0	18)
	S.suicanis, ZZE	ELISA	0-2	18)
	S.suicanis, ZZE/ZZ	ELISA, IHA/IFAT	pos	24)
	S.bovicanis, ZZE	ELISA	+1-0	18)
S.suihominis	S.bovihominis, ZZE	ELISA	+1-0	18)
	S.gracilis, SZE	ELISA	0	18)
	S.ovicanis, ZZE	ELISA	0	18)
	S.ovifelis, ZZE/ZWE	ELISA	0-1/1	18)

Tabelle 1

(Fortsetzung)

Bestehende Infektion	Verwendetes Antigen	Methode	Unterschied*	Autor (Nr.)
S.bovicanis	S.muris, ZZE/ZZ	ELISA, IHA/IFAT	pos	28)
	S.ovicanis, ZZ	IFAT	pos	28)
	S.ovifelis, ZZE/ZZ	ELISA/IFAT	pos	28)
S.bovifelis	S.bovicanis, ZZE	ELISA	pos	18)
	S.bovihominis, ZZE	ELISA	pos	18)
	S.gracilis, ZZE	ELISA	pos	18)
	S.ovicanis, ZZE	ELISA	pos	18)
	S.ovifelis, ZZE, ZZE	ELISA	pos	18)
	S.suicanis, ZZE, ZZE	ELISA	pos	18)
	S.suihominis, ZZE	ELISA	pos	18)
	S.bovihominis, ZZ	IFAT	pos	28)
S.sp.(Rind)	S.ovifelis, ZZE/ZZ	ELISA/IFAT	pos	28)
	S.muris, ZZE/ZZ	ELISA, IHA/IFAT	pos	28)
	S.cernae, ZZE	ELISA	pos	34)
	S.dispersa, ZZ	IFAT	pos	8)
S.ovicanis u.	S.dispersa, ZZE	IHA	3-5	8)
	S.cuniculi, ZZ	IFAT	pos	6)
	S.dispersa, ZZE	IHA	pos	7)

Tab.1:

In serologischen Untersuchungen aufgetretene Kreuzreaktionen zwischen verschiedenen Sarkosporidienarten und -stadien.

* Verdünnungsstufen der 2-er Reihe, um die das heterologe Antigen schwächer (oder stärker = +) reagiert als das homologe.

pos = Titerunterschied nicht genannt, Kreuzreaktion

neg = keine Kreuzreaktion

"Autor (Nr.)" bezieht sich auf die Nummern des Literaturverzeichnisses.

Die Aufbereitungsart der Antigene bleibt nicht ohne Einfluß auf das Ergebnis der serologischen Reaktionen. So berichten KEPPEL (1981), REITER und Mitarb. (1981), O'DONOGHUE und WEYRETER (1982), WEILAND, REITER und BOCH (1982) sowie WEYRETER und O'DONOGHUE (1982), daß die Gewinnung der Parasiten durch Trypsinverdauung um 1-2 Verdünnungsstufen niedrigere Ergebnisse bringt im Vergleich zu mechanisch befreitem Ausgangsmaterial.

Der Nachweis zirkulierender Sarcocystis-Antigene im Serum infizierter Schweine und Mäuse gelang O'DONOGHUE und WEYRETER (1983) mit Hilfe eines "double-antibody sandwich ELISA" (DAS-ELISA). Dafür benützten sie gereinigte Hochimmunseren von Kaninchen gegen Extrakte aus *S.suicanis*- und *S.muris*-Zystozoiten. Antigene ließen sich zu einem Zeitpunkt nachweisen, als noch keine Muskelzysten gebildet waren; somit muß eine Antigengemeinschaft zwischen den verschiedenen Entwicklungsstadien des Parasiten bestehen. Auch ergaben homologe Sporozoitenextrakte gleich deutliche Reaktionen im DAS-ELISA. Die Immunodiffusion zeigte starke Kreuzreaktionen zwischen beiden Spezies.

Antigene verschiedener Sarkosporidienarten trennte KLIMA (1979) an Ultrogel ACA 22 und ACA 44 säulenchromatographisch auf. Hierbei lieferten Zystozoitenextrakte von *S.ovifelis* und *S.suihominis* zwei deutliche, solche von *S.ovicanis* zwei weniger ausgeprägte und von *S.bovihominis* nur eine Fraktion. Ein Zystenwand-Extrakt von *S.ovifelis* ergab drei, wenn auch unscharfe Fraktionen. Sporozoitenextrakte aus *S.suicanis* und *S.gracilis* ließen sich nicht auftrennen. Auch die vergleichende Anwendung der Gesamtextrakte und ihrer Fraktionen im ELISA brachte nur geringe Titerunterschiede und ermöglichte damit keine

Artendifferenzierung. Ebenso traten merkliche Unterschiede weder zwischen Zystozoiten- und Sporozoitenextrakt, noch zwischen Zystozoiten- und Zystenwandantigen auf.

Umfangreiche Untersuchungen führten O'DONOGHUE und WEYRETER (1982) an Sporozoiten- und Zystozoiten-Hochimmunseren sowie an Zwischenwirtsseren vom Zeitpunkt der Schizogonie durch. Deren Reaktionen mit Sporozoiten und Zystozoiten und ihren Extrakten sowie mit Gefrierschnitten von Schizonten wiesen die Zystozoiten als stark, die Sporozoiten als schwach antigen aus. Daher wurden aus Zystozoiten verschiedener *Sarcocystis*-Arten lösliche Rohantigene gewonnen. Mit Sephadex G-200 aufgetrennt zeigten sich zwei Fraktionen von 5000 und 600000 Dalton. Mittels SDS (= sodium dodecyl sulfate)-Poly-acrylamid-Gel-Elektrophorese waren im Gesamtrohantigen 9 Peptide zu identifizieren, in der ersten Fraktion 4 und in der zweiten Fraktion keines; alle lagen zwischen 13000 und 49000 Dalton. Auch diese Ergebnisse waren für die untersuchten Arten weitgehend identisch. Die Autoren stellten ferner fest, daß eine längere Trypsinverdauung bei der Gewinnung von Zystozoiten den Verlust der Fraktion 1 mit sich brachte. Da die IgG-Globuline, die erst in der postakuten Phase der Infektion auftreten, am besten mit dieser Fraktion 1 reagierten, nehmen die Autoren eine spezifische Wirkung gegen Oberflächenantigene später Entwicklungsstadien an. Dagegen reagierte Fraktion 2, die durch Trypsin nicht beeinträchtigt wurde, am stärksten mit den zu Beginn der Infektion auftretenden IgM-Antikörpern. Diese zielten somit auf Protoplasma-Antigene früher Parasitenstadien.

ABBAS und POWELL (1983) untersuchten verschiedene Antigenpräparationen von *S.muris*. Die Extraktion der mittels

Trypsinverdauung gewonnenen Zystozoitien erfolgte auf dreierlei Arten: Gefrieren und Auftauen, Zugabe eines Detergens (0,1% Triton X-100) und Kombination dieser beiden Methoden. In den Ergebnissen unterschieden sich die 3 Verfahren nur unwesentlich. Die Immunodiffusion mit Seren infizierter Mäuse ergab eine kräftige - ähnlich wie LUNDE und FAYER (1977) sie für *S.bovicanis* ermittelten -, nach 1-2 Wochen zwei weitere schwache Banden. Auch in der Immunelektrophorese trat nach 3 Tagen eine deutliche Bande auf. Mit Hochimmunseren waren in der Immunodiffusion 4-5 Banden, in der Immunelektrophorese ein noch komplexeres Muster nachweisbar. Mittels der SDS-Poly-acryl-amidgel-Elektrophorese bestimmten die Autoren für die im Extrakt enthaltenen 8 Polypeptide Molkulargewichte zwischen 10000 und 220000; dabei lag der Großteil im Bereich 10000 bis 18000, das mengenmäßig am stärksten vertretene Polypeptid bei 10000.

Auch Antigene, die sie durch Immunopräzipitation aus Extrakten von radioaktiv oberflächenmarkierten Zystozoitien gewonnen hatten, untersuchten die Verfasser mit diesem Verfahren. Unabhängig davon, ob die Präzipitation mit Mäuse- oder Hochimmunserum durchgeführt worden war, fanden sich in den Autoradiogrammen Spuren von drei Peptiden mit 27000, 43000 und 90000 Dalton. Die höchste Radioaktivität zeigte der Bereich des kleinsten Antigens. Die im Autoradiogramm nicht erschienenen Polypeptide lagen nach Ansicht der Autoren entweder nicht an der Parasitenoberfläche oder hatten keine antigene Wirkung.

Zumindest für die Sarkosporidien jener Zwischenwirte, die bei bestehender Immunität gegen eine homologe Infektion noch empfänglich für heterologe Infektionen sind, kann

davon ausgegangen werden, daß der Wirt mit unterschiedlichen Antigenen konfrontiert wird. Andererseits läßt sich aus der Tatsache, daß auch in diesen Fällen keine Artendifferenzierung durch serologische Tests geglückt ist, auf weitreichende Gemeinsamkeiten schließen. Auch eine Auftrennung von Antigenextrakten nach der Molekülmasse und die Verwendung solcher Fraktionen in der Serologie haben bisher keine Speziesunterscheidung ermöglicht. Es war deshalb das Ziel meiner Arbeit, zu untersuchen, ob sich durch Antigenauftrennung nach einem anderen Prinzip, nämlich nach isoelektrischen Punkten, artenspezifische Fraktionen identifizieren lassen.

Je höher das Auflösungsvermögen eines Trennverfahrens ist, desto besser sind natürlich die Aussichten, eine geeignete Fraktion zu erhalten. Die isoelektrische Fokussierung in dünnen Flachgelen trennt noch Proteine mit nur um 0.02 Werte differierenden isoelektrischen Punkten (RIGHETTI und RIGHETTI, 1975). Durch die von TOWBIN, STAEHELIN und GORDON (1979) entwickelte elektrophoretische Übertragung vom Gel auf eine Nitrozellulosemembran (=Electroblotting) werden die Proteine ohne Denaturierung in situ immobilisiert und sind so z.B. für serologische Reaktionen verfügbar.

III. EIGENE UNTERSUCHUNGEN

A. Material und Methoden

Für die Antigengewinnung inokulierte ich 40 Schwarzmäusen (Hausmaus x NMRI-Maus) der institutseigenen Zucht mittels Knopfkanüle je 1000 S. muris-, zwei Wochen später ebensovielen Tieren je 2000 S. dispersa-Sporozysten. Einen Tag nach der Infektion kamen sie in autoklavierten Käfigen in einen speziellen Versuchstierstall. Zwischen dem 82. und 90. Tag p.i. wurden die Versuchstiere getötet. Die gewonnenen Seren lagerte ich bei -24°C für die spätere Verwendung. Um Titterschwankungen im EIA auszuschalten, faßte ich sie nach einem Teil der Versuche zu Pools zusammen.

Von denjenigen Mäusen, die nach dem Enthäuten schon makroskopisch Zystenbefall zeigten, wurde die Muskulatur eng mit Einschnitten versehen und bei Raumtemperatur unter Rühren in einer gefilterten Lösung von 2,5g Trypsin (Difco 1:250) pro Liter isotonischer Kochsalzlösung 20 Minuten verdaut. Zur Grobreinigung seichte ich die so erhaltene Zystozoitensuspension durch ein handelsübliches Kaffeesieb, dann durch Nylongaze von 100 µm und 20 µm Maschenweite. Anschließend wurden die Zystozoiten 3 mal durch Zentrifugieren bei 900xg und Resuspendieren in isotonischer Kochsalzlösung gewaschen.

Die eine Hälfte dieser Zystozoiten resuspendierte ich dann in 0,9% NaCl, die andere in einer Lösung von je 0,5% Saponin (Sigma S-1252) und n-Octyl-β-D-glucopyranosid (Merck 6948) entsprechend der Erfahrungen von HUGHES und BALFOUR (1981); die Autoren hatten bei der Extraktion von Toxoplasma-Antigen mit dieser Mischung gute Ergebnisse

erzielt. Zu je 10 ml der Suspension gab ich 3 Tropfen 1%iges Natriumazid, brachte sie für 20 Minuten in einen eiswassergekühlten Zellhomogenisator (Calora) und ultraschallte (Branson B-12) dann so lange, bis sie keine intakten Zystozoiten mehr enthielt.

Die Extraktion erfolgte durch Rühren bei 4°C über Nacht. Nach einstündigem Zentrifugieren mit 48 200 xg bei 4°C (Sorvall RC-2 B) portionierte ich den klaren Überstand zu 100 µl in Reagenzgefäßen (Brand 78 05 00) und lagerte ihn, nach Herstellungstagen getrennt, bei -24°C bis zur Verwendung. Mittels der Folin-Ciocalteu-Methode wurde der Proteingehalt bestimmt. Einen Teil der Extrakte überarbeitete ich später, der Empfehlung von Serva folgend, durch Dialyse (Visking-Schlauch, Serva Typ 36/32) gegen 0,23% NaCl-Lösung bei 4°C über Nacht und anschließendes 15-minütiges Zentrifugieren mit 25 000 xg bei 10°C. Bei der Proteinbestimmung war dann nur noch ein Viertel der ursprünglichen Konzentration festzustellen, obwohl sich das Volumen kaum geändert hatte. Die daher bei niedrigen Ausgangswerten notwendige Einengung erreichte ich durch Lyophilisieren und Rekonstituieren mit einer entsprechend geringen Menge Aqua dest.

Gegen die Zystozoitenextrakte mit und ohne Detergentien, sowie jeweils gegen Zystozoitensediment, Trypsin, komplettes Freundsches Adjuvans (Behringwerke) und einen Extrakt aus Schwarzmausmuskulatur wurden Hochimmunseren in Kaninchen hergestellt. Die erste, subkutane Dosis enthielt 2 mg des löslichen, 20 Minuten bei 56°C inaktivierten Antigenextraktes bzw. eine nicht näher bestimmte geringe Menge des Sediments, emulgiert mit komplettem bzw. inkomplettem Freundschem Adjuvans. 4 und 6 Wochen

danach wurde jeweils die doppelte Antigenmenge der vorhergehenden ohne Adjuvans intramuskulär verabreicht. Das 5-7 Tage nach der letzten Injektion gewonnene Serum lagerte ich bei -24°C .

Für die isoelektrische Fokussierung verwendete ich das LKB Ultrophor 2217, das Netzgerät LKB 2103 und den Kryostat LKB 2209. In Vorversuchen nahm ich Agarosegele der Stärken 0,5 mm, 0,75 mm, 1,2 mm und 2,0 mm (Materialien und Anleitung von LKB) sowie fertige Polyacrylamidgele der Stärken 0,1 mm (Servalyt Precotes pH 3-10) und 1,0 mm (LKB PAGplates pH 3,5-9,5). In den Hauptversuchen kamen ausschließlich die letzteren in Kombination mit Serva Elektrodenlösungen (Nr. 42984 und 42986) zur Anwendung. Applikatorstreifen von Serva lieferten mit der Färbung bessere Ergebnisse als die Filterpapierstückchen von LKB. Jedoch mußte zur Verhinderung des Ineinanderfließens der Antigene, wie von Serva empfohlen, Silikonöl angewandt werden. Dieses reagierte heftig im EIA und machte deshalb den Einsatz der Applikatorstreifen unmöglich. Die mit dem Gel gelieferten Probenauftragsplättchen legte ich mit ihrem Zentrum 8 mm vom Anodendoht entfernt auf. Am Netzgerät stellte ich für halbe Gele als Obergrenzen 2,0 kV, 50 mA und 15 W ein. Für ganze PAG-Platten (Länge 245 mm) verdoppelte ich Strom und Leistung. Nach 30-minütigem Vorfokussieren trug ich die Proben mit einer variablen Kolbenhubpipette auf die Filterplättchen auf, fokussierte 30 Minuten, nahm dann die Plättchen vom Gel und fokussierte weitere 30 Minuten. Als Ausgangswert diente 75 μg Protein pro Probe.

Um den pH-Gradienten besser zu reproduzieren, modifizierte ich das Verfahren später und ging dann folgendermaßen vor: Obergrenze Spannung 1,6 kV; Stromstärke so, daß sich

eine Anfangsspannung von 0,30 kV ergab; Leistung 16 W (32 W für ganzes PAGplate). Nach 30 Minuten erfolgte die Probenauftragung. Eine Stunde später nahm ich die Aufgabeplättchen ab und fokussierte ca. 45 Minuten weiter, bis genau 1,50 kV erreicht waren. Der Kryostat war auf eine Kühlwassertemperatur von 10°C eingestellt.

Ein Knick pH-Meter (Typ 647) mit Oberflächenelektrode von Ingold sowie ein Knick Thermosensor (PT 100) dienten zur pH-Messung auf dem Gel. Da die pH-Elektrode bei der von mir verwendeten Temperatur nur sehr langsam reagierte, bestimmte ich damit in Vorversuchen, unter gleichen Bedingungen wie bei der Fokussierung der Antigene, die unter diesen Voraussetzungen gültigen pI-Werte der Vergleichsproteine von Pharmacia (17-0471-01). Von diesen ausgehend ermittelte ich dann durch Interpolation die pIs der Antigen-Banden.

Gelfärbungen führte ich mit Coomassie Blau R-250 (Merck 12 553) entsprechend den Angaben von LKB durch.

Für das Electroblotting verwendete ich die Trans-Blot Cell von Bio Rad und das zugehörige Netzgerät 160/1,6. Als Medium gebrauchte ich, wie von TOWBIN, STAEHELIN und GORDON (1979) für SDS-Gele beschrieben, einen Tris-Glycin-Puffer. Dafür löste ich 7,0 g Tris (Merck 8382) und 25,0 g Glykokoll (Merck 4201) in 2,0 l Aqua demin., entgaste diese Lösung kurz (BURNETTE, 1981) und setzte dann 0,5 l Methanol (Merck 6008) zu. Unmittelbar nach der Fokussierung nahm ich die Elektrodendochte ab und legte ein die gesamte Oberfläche bedeckendes Stück trockenen Filterpapiers (Whatman Nr.1) auf das Gel. Nachdem ich dieses Sandwich auf seine Filterpapierseite gedreht und

eventuell vorhandene Luftblasen herausgestrichen hatte, zog ich die Trägerfolie vom Gel ab, belegte es mit passenden, in Blottingpuffer angefeuchteten Nitrozelluloseabschnitten (Schleicher&Schuell PH79) und strich diese mit einem Spatel fest. Dazu kamen beiderseits noch je zwei in Puffer getränkte Filterpapierblätter. Dann wurde diese möglichst luftblasenfreie Kombination, Nitrozellulose nach oben, auf ein "Scotch Brite" gelegt.

Auf dem Filterpapier belegte ich die vom Gel nicht eingenommenen Bereiche mit passenden Streifen der Kunststoffolie, die zum Versiegeln der gefärbten PAGplates mitgeliefert wird. Darauf kam schließlich ein vollgesogenes Schaumstoffhaltekissen. Wenn die Haltekassette in die Trans-Blot Zelle gesteckt war, lag die Nitrozellulose auf der anodenseitigen Geloberfläche. Das Blotting dauerte 2 Stunden bei maximaler Leistung des Netzgerätes, was etwa 170 V bei 0,45 A entsprach. Die Kühlschlange der Zelle wurde währenddessen vom Kühlmittel mit 0°C durchströmt und der Puffer in der Zelle durch einen Magnetrührer umgewälzt, so daß 25°C nicht überschritten wurden. Sofort nach dem Blotting zog ich die Nitrozellulose vom Gel ab und lagerte sie zwischen trockenem Filterpapier bei -24°C bis zur Verwendung am nächsten Tag.

In Vorversuchen verwendete ich für die Färbung der Blots neben Coomassie Blau (BURNETTE, 1981) auch Fast Green (BioRad 1610409), Serva Blau W (35053) und Rotring Tusche (Art: 5911) in Anlehnung an HANCOCK und TSANG (1983). In den Hauptversuchen kam nur die Coomassie-Färbung zur Anwendung. Dabei wurde die Nitrozellulose 5 Minuten in einer Lösung von 0,2% Coomassie Blau R-250, 40% Methanol und 10% Essigsäure in Aqua demin. auf dem Schüttler ge-

färbt (60 C). Ebenfalls 5 Minuten wirkte der Entfärber aus 90% Methanol, 8% Aqua demin. und 2% Essigsäure ein. Später benutzte ich 25% Aqua demin. und 5% Essigsäure in Methanol als Entfärbelösung, um das Schrumpfen der Nitrozellulose zu verringern.

Das Enzyme Immuno Assay (EIA) führte ich unter Modifikation der Angaben von TOWBIN, STAEBELIN und GORDON (1979) in folgenden Schritten durch:

- Blockieren der freien Bindungskapazität der Nitrozellulose mit 6% bovinem Serumalbumin (=BSA) in phosphatgepufferter Kochsalzlösung, pH 7.2 (=PBS) 1 Stunde bei 37°C auf dem Taumelgerät,
- Abspülen mit PBS,
- Inkubation wie oben, jedoch unter Zusatz von Mäuseserum (1:15) oder Hochimmunserum (1:70),
- Abspülen mit PBS,
- 30 Minuten Waschen in PBS auf dem Taumelgerät bei Raumtemperatur, 3x Wechsel der Waschflüssigkeit,
- 2 Stunden Inkubation mit Anti-IgG-Peroxidase (H+L) (Institut Pasteur) 1:350 in 6% BSA bei Raumtemperatur auf dem Taumelgerät,
- Abspülen mit PBS,
- 30 Minuten Waschen wie oben,
- Zugabe der Substratlösung,
- Unterbrechen der Farbentwicklung durch Waschen mit Aqua demin. nach 1-5 Minuten.

Als Substratstammlösung (nach LUCIUS, pers. Mitteilung) diente mir 0,3% 4-Chloro-1-Naphtol (Sigma C8890) in Methanol. Zum Gebrauch mischte ich 2 ml dieser Lösung mit 50 ml PBS und 10 µl Wasserstoffperoxid.

Das ELISA führte ich folgendermaßen durch:

- 100 µl Antigenlösung in jede Vertiefung (10 µg/ml Antigen in Karbonat-Bikarbonat-Puffer pH 9,6),
- Lagern im Kühlschrank über Nacht,
- 3 Stunden bei 37°C in der feuchten Kammer,
- Waschen, erst mit Leitungswasser, dann mit PBS-Tween 20 (0,05%), Ausklopfen,
- Anlegen einer 2er Verdünnungsreihe der Seren mit 0,5%igem BSA, 50 µl je Vertiefung, 1 Stunde bei 37°C in der feuchten Kammer,
- Waschen wie oben,
- Anti-IgG-Peroxidase (H+L) (Institut Pasteur) 1:1000 in 4%igem BSA in PBS, 50 µl je Vertiefung, 1 Stunde bei 37°C in der feuchten Kammer,
- Waschen wie oben,
- je 100 µl Substratlösung (400 mg 5-Amino-2-Hydroxybenzoesäure in 500 ml Aqua dest. = Stammlösung), mit 1n NaOH auf pH 6,0 eingestellt und 10:1 mit 0,05%igem Wasserstoffperoxid gemischt, 1 Stunde bei Raumtemperatur,
- Messen im Photometer (Titertek Multiskan) bei 450 nm.

Die Extinktionen wurden auf Diskette gespeichert und über einen "Personal-Computer" (Commodore 4032) und einen Plotter (Hewlett-Packard 7475A) als Kurven ausgegeben.

Antigen-Fractionen für das ELISA gewann ich durch Ausschneiden von Streifen aus fokussierten Gelen und Homogenisieren mit Ultraschall. Diese Antigenlösung enthielt also auch Ampholyte und Polyacrylamid-Trümmer (5-50 µm).

B. Ergebnisse

Beim Vergleich von Fokussierungen, die unter gleichen Bedingungen an verschiedenen Tagen gelaufen waren, zeigte sich sowohl in den Färbungen als auch im EIA, daß bei *S.dispersa* öfters die Banden ab pI 5,20 bis zur Kathode abgeschwächt erschienen oder gar nicht aufzufinden waren. Dies geschah auch mit in gleicher Menge aufgetragenen und vom gleichen Herstellungstag stammenden Antigenextrakten. Bei der Suche nach der Ursache bemerkte ich, daß die aufgetauten Antigene, auch jene von *S.muris*, trotz der gründlichen Zentrifugation vor dem Einfrieren, ein Sediment gebildet hatten. Ich vermutete daher, daß wegen der Präzipitation unterschiedliche Antigenmengen auf das Gel gelangt waren. Gleichzeitig sah ich in dieser Neigung zu Ausfällungen eine Erklärung für Verschattungen, die in den Antigen-"straßen" der gefärbten Gele zu erkennen waren und sich auch im EIA störend bemerkbar machten.

Versuche, durch Rühren über Nacht, durch Zugabe von 0,5% Ampholyten oder von Harnstoff (8 Mol/l) die Niederschläge in den Extrakten wieder in Lösung zu bringen, führten nicht zum Erfolg. Ich faßte daher die portionierten Extrakte wieder chargenweise zusammen und zentrifugierte die ausgefallenen Bestandteile ab. Hierbei führte ich auch eine Dialyse durch, um gegen manchmal in der Fokussierung auftretende Laufverzerrungen anzugehen. Sogar geringere Mengen der so überarbeiteten Extrakte lieferten im EIA zusätzlich Banden weiterer pI-Werte gegenüber den vorher erhaltenen Mustern. Das oben geschilderte Verschwinden von *S.dispersa*-Banden war dadurch jedoch nicht behoben. Die unter Verwendung von Saponin und n-Octyl gewonnenen Antigene neigten weniger zu solchen Verlusten als diejenigen ohne Detergentien.

1. Antigendifferenzierung auf Grund der Proteinmuster

Durch höhere Antigenmengen ließen sich in den Coomassie-gefärbten Gelen schwache Banden deutlicher darstellen. Auch waren unter Zugrundelegung der Proteinbestimmung für gleiche Ergebnisse vom überarbeiteten Antigen geringere Mengen nötig als vom nicht überarbeiteten (Abb. 1).

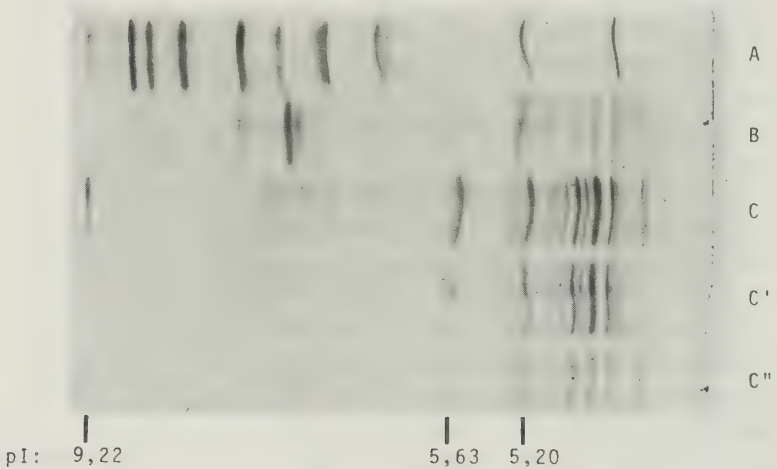


Abb.1: Elektropherogramme verschieden bearbeiteter *Sarcocystis dispersa*-Antigene.

A: Vergleichsproteinmischung

B: *S.muris*-Antigen, überarbeitet, 64,9 µg (eingeengt)

C: *S.dispersa*-Antigen, überarbeitet, 129,5 µg, (eingeengt)

C': *S.dispersa*-Antigen, überarbeitet, 47,2 µg, (nicht eingeengt)

C'': *S.dispersa*-Antigen, nicht überarbeitet, 145,5 µg

S.muris-Antigen lieferte bis zu 41, S.dispersa maximal 37 Banden. Der Bereich von pI 5.20 bis zur Anode (pH 3,50) enthielt am dichtesten gedrängt die schärfsten Banden, von denen sich 16 bei S.muris und 13 bei S.dispersa differenzieren ließen (Abb. 2). Die Elektropherogramme unterschieden sich hier allerdings nur bezüglich Intensität und Breite entsprechender Banden.

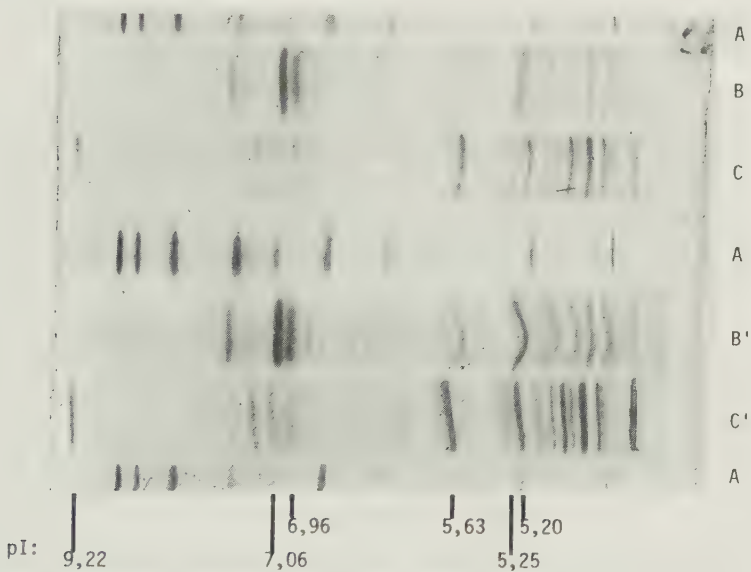


Abb.2: Proteinmuster von Sarcocystis muris und S.dispersa-Antigenen (verschiedene Auftragsmengen)

- A : Vergleichsproteinmischung
- B : S.muris-Antigen (74,9 µg)
- B' : S.muris-Antigen (118,0 µg)
- C : S.dispersa-Antigen (76,2 µg)
- C' : S.dispersa-Antigen (152,4 µg)

Markant traten bei *S.muris* pI 5,25, 6.96 und 7.06, bei *S.dispersa* 5.20, 5.63 und 9.22 hervor. Banden dieser pI-Werte erschienen auch bei der jeweils anderen Art, jedoch deutlich schwächer. Der Bereich über 5,20 von *S.dispersa* wies bei verschiedenen Fokussierungen starke Intensitätsunterschiede auf, ohne daß dies methodisch bedingt sein konnte.

Eine Unterscheidung der Zystozoenextrakte beider Spezies war anhand ihrer Proteinmuster eindeutig möglich.

Die proteingefärbten Blots erschienen weniger kontrastreich und zeigten ein geringeres Auflösungsvermögen als die Gele (Abb. 3). Es wirkten z.B. 3 auf dem Gel in einem Bereich von 1mm unterscheidbare *S.muris*-Linien (pI 5,05 - 5,10) auf dem Blot nur noch wie eine breite Bande.

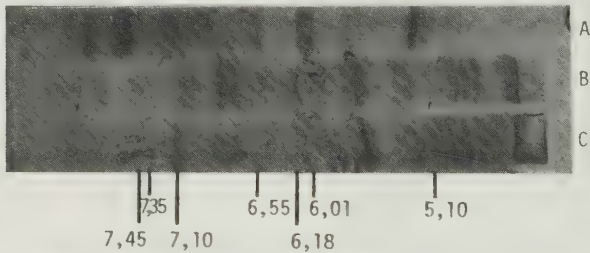


Abb.3: Coomassie-gefärbte Nitrozellulose mit *Sarcocystis muris*- und *S.dispersa*-Antigen nach Elektrofokussierung und Elektroblothing

A : Vergleichsproteinmischung

B : *S.muris*-Antigen

C : *S.dispersa*-Antigen

Anhaftende Gelreste erscheinen als schwarze Flecken

Einige Banden (*S.muris*: 6,18, 6,55, 7,33-7,45; *S.dispersa*: 6,01, 7,10) traten kräftiger hervor als im gefärbten Gel. Andererseits ließen sich von den Vergleichsproteinen Soja-Trypsininhibitor (pI 4,60) und Amyloglucosidase (pI 3,50) sowie vom *S.dispersa*-Extrakt pI 9,22 nicht auf die Nitrozellulose übertragen. Ein weiterer Verlust an Banden durch das Blotting trat nicht auf, kann allerdings wegen des geschilderten Schärfeverlustes auch nicht gänzlich ausgeschlossen werden.

2. Reaktionen der fraktionierten Antigene

a. Mit Hochimmunseren

Im Enzyme Immuno Assay mit homologen Hochimmunseren gegen Zystozoen-Extraktantigen ergaben sich für beide *Sarcocystis*-Arten konstante Muster, die jedoch bezüglich ihrer Vollständigkeit die geschilderten Variationen aufwiesen. Bei insgesamt größerer Menge des gleichen Antigens auf dem Gel erschienen, ähnlich wie nach der Proteinfärbung, zusätzliche Banden; andere wiederum traten intensiver und breiter zutage, so daß sie sich teilweise mit Nachbarbanden überlagerten. Dies zeigte sich in allen Antigen-Serum-Kombinationen.

Hochimmunserum (=HIS) gegen Zystozoen-Sediment lieferte die gleichen Ergebnisse wie das gegen den Überstand gebildete.

Bei *S.muris* (Abb.4) dominierten 4 Banden zwischen pI 5,41 und 5,68, 2 bei 6,56 und 6,96 und 2 breite, unscharfe bei 7,29 und 7,60. Mit überarbeitetem Antigen ließen sich zusätzlich - neben anderen - 3 Banden bei 8,03, 8,35 und 8,58 erzielen.

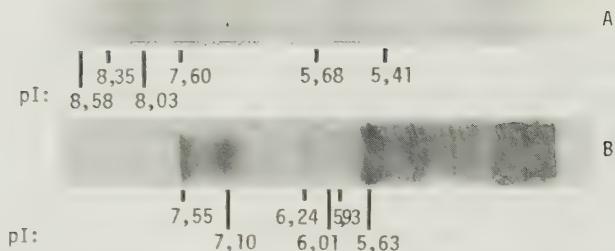


Abb.4: Enzyme Immuno Assay mit homologen Hochimmunseren nach Electoblotting

A : *Sarcocystis muris*-Antigen

B : *Sarcocystis dispersa*-Antigen

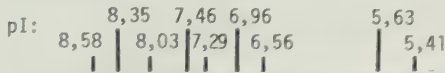
Für *S.dispersa* waren außer pI 5,63 noch 5,93, 6,01, 6,24 und 7,10 charakteristisch; dazu kam mit überarbeitetem Antigen pI 7,55 (Abb. 4). Einige sehr schwache, noch basischere Banden zeigten sich, im Gegensatz zum Reaktionsbild von *S.muris* und homologem HIS, nur gelegentlich.

Mit den heterologen HIS traten bei beiden Spezies nur gelegentlich vereinzelte, sehr schwache Banden auf. An der Stelle, die das Probenaufgabestück eingenommen hatte, war stets eine Reaktion zu erkennen.

Die zur Kontrolle der Antigenreinheit erzeugten Hochimmunseren gegen Schwarzmausmuskulatur und gegen Trypsin zeigten, ebenso wie Normalkaninchenserum, keine Reaktion mit den Sarkosporidienantigenen. Alle verwendeten Seren reagierten mit den Linsen-Lectinen (pI 8,15, 8,45 und 8,65) der Vergleichsproteinmischung. Antigene, die unter Verwendung von Saponin/n-Octyl extrahiert worden waren, brachten eine zusätzliche Bande bei 3,60. Für *S.dispersa* zeitigte in diesem Fall das Hochimmunserum gegen Antigen ohne Detergentien noch eine weitere Bande bei pI 3,50, während das Serum gegen detergentienhaltiges Antigen nur ganz fein deren Rand erbrachte.

b. Mit Seren experimentell infizierter Mäuse

Mit homologem Mäuseserum lieferte *S.muris*-Antigen als charakteristische Banden pI 5,41, 5,63, 6,56, 6,96, 7,29 und 7,46 (Abb. 5). Im Vergleich zum Hochimmunserum erschien der Bereich von 7,46 bis zur Kathode schwächer, 6,56 und 6,96 stärker, das Bild insgesamt differenzierter. Das heterologe Mäuseserum führte gegenüber dem homologen zu folgenden Unterschieden: pI 5,41 bis 5,63, 6,56, 6,96, 7,29 und 7,46 waren deutlich schwächer, 8,03 bis 8,58 statt schwach gar nicht sichtbar, 4,68 bis 4,95 etwas stärker (Abb. 5).



pI: 4,95 4,77

Abb.5: Enzyme Immuno Assay mit homologem und heterologem Mäuseserum auf *Sarcocystis muris*-Antigen nach Electroblothing

a : homologes Mäuse-Poolserum

b : heterologes Mäuse-Poolserum

S.dispersa und homologes Mäuseserum zeigten am deutlichsten pI 5,63, 6,24 und 6,54; besonders auf nicht überarbeiteten Antigen kamen 4,68, 4,77 und 4,95 klarer als mit dem HIS. Einige Banden ab 6,54 erschienen nur sporadisch. Heterologes Mäuseserum brachte einerseits pI 5,63, 6,24, 6,54, 7,29 und 7,55 sowie den Bereich von 5,34 bis zur Anode (besonders ab 4,64) schwächer, andererseits 6,37 und 7,10, wenn vorhanden, kräftiger, 6,62 sogar zusätzlich gegenüber dem homologen Serum (Abb. 6).

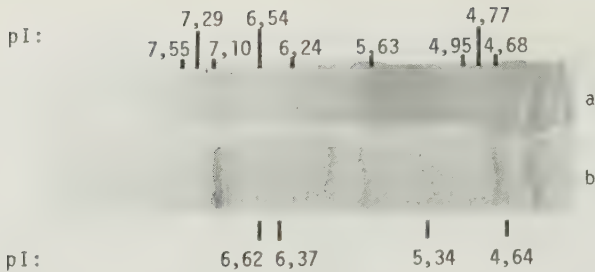


Abb.6: Enzyme Immuno Assay mit homologem und hetero-
logem Mäuseserum auf Sarcocystis dispersa-
Antigen nach Electroblothing
a : homologes Mäuse-Poolserum
b : heterologes Mäuse-Poolserum

Die geschilderten Unterschiede zwischen Blot-EIAs mit homologen und heterologen Zwischenwirtsseren ermöglichten eindeutig die Spezies-Zuordnung des jeweils zur Anwendung gekommenen Serums.

Alle, auch die negativen Mäuseseren lieferten auf Schwarzmausmuskelextrakt zwischen pI 6,00 und 6,20 eine diffuse, offensichtlich unspezifische Reaktion.

3. Reaktionen isolierter Antigenfraktionen im ELISA

Um die Brauchbarkeit einzelner Antigenfraktionen im ELISA zu testen, schnitt ich in Frage kommende Bereiche aus fokussierten Gelen aus, zerkleinerte sie mittels Ultraschall und setzte sie so als Antigene ein.

Vom S.muris-Antigen wählte ich auf Grund der Ergebnisse der Immunoblots als spezifische Fraktionen pI 5,41, 6,96, 7,29-7,46 und 8,35. Außer Pool- und Negativseren wurden auch Einzelseren experimentell infizierter und parasitologisch positiver Mäuse eingesetzt.

Alle 4 Fraktionen erwiesen sich als geeignet für die eindeutige Differenzierung der verwendeten Pool- und Einzelseren. Die aufgetretenen Unterschiede waren groß genug für eine sichere grobsinnliche Beurteilung der Mikrotiterplatten (Abb. 7).

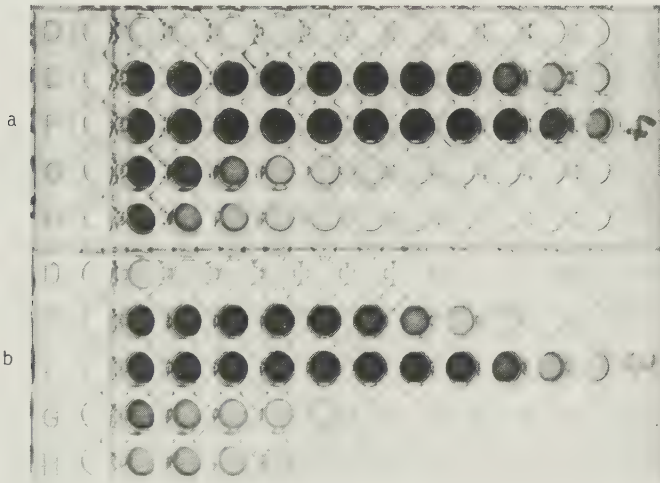


Abb.7: Pool- und Einzelseren experimentell infizierter Mäuse
im ELISA mit *Sarcocystis muris*-Antigenfraktionen
a : pI 5,41 (Mikrotiterplatte zu Abb.8)
b : pI 6,96 (Mikrotiterplatte zu Abb.9)
linke senkrechte Reihe = Konjugat-Substrat-Kontrolle
D = Negativkontrolle
E = *S.muris*-Poolserum
F = *S.muris*-Einzelserum
G = *S.dispersa*-Poolserum
H = *S.dispersa*-Einzelserum

In den Extinktionsdiagrammen (Abb. 8 und 9) dieser ELISAs trat der Graph des S.muris-Poolserums, nach Maximalwerten bei 1,10-1,00, zwischen 0,90 und 0,80 aus der Sättigung in den spezifischen Bereich (Wendepunkt). Die Kurven des S.dispersa-Pools zeigten mit diesen Antigenfraktionen keine Sättigung und begannen durchweg bei niedrigeren Anfangsextinktionen (in der Regel kleiner als 0,90). Sie verliefen außerdem flacher, näherten sich also mit steigender Verdünnung dem S.muris-Graphen.

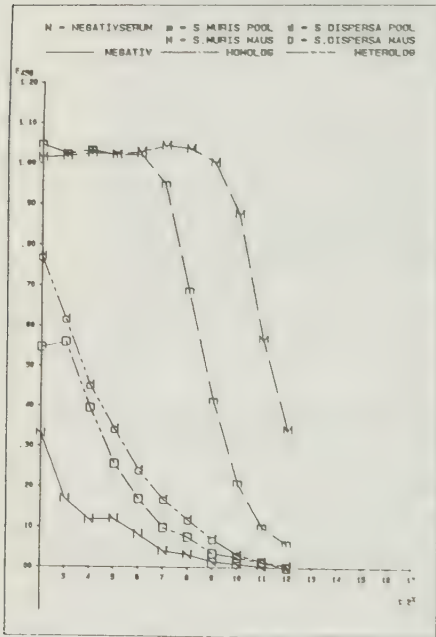


Abb.8:Pool- und Einzelseren experimentell infizierter Mäuse im ELISA mit *Sarcocystis muris*-Antigenfraktion pI 5,41

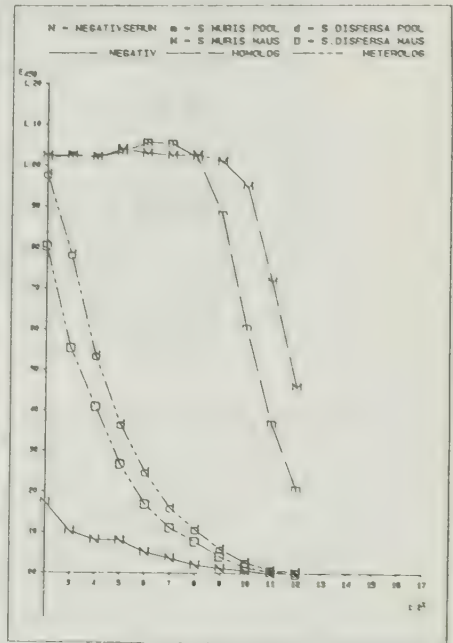


Abb.9:Pool- und Einzelseren experimentell infizierter Mäuse im ELISA mit *Sarcocystis muris*-Antigenfraktion pI 6,96

Als Maßstab für die Artspezifität der Antigenfraktionen wählte ich deshalb die Titerdifferenz, die sich aus dem Abstand der beiden Pool-Kurven bei $E_{450} = 0,70$ ergab. Mit Fraktion pI 8,35 jedoch lagen in der ersten Verdünnungsstufe die Extinktionen des S.dispersa-Serums im Durchschnitt nur in halber Höhe des homologen Gegenstücks. Deshalb ging ich hier bei der Bewertung von der jeweils höchsten S.dispersa-Extinktion aus.

Verglichen mit dem unfractionierten Antigen zeigten über das ganze Gel reichende Querschnitte der fokussierten Antigene im Kurvenverlauf keinen wesentlichen Unterschied. Der durchschnittliche Abstand zwischen homologen und heterologen Poolseren bei $E_{450} = 0,70$ betrug 2,5 bzw. 2,8 Verdünnungsstufen (Abb. 10 und 11). Mit den einzelnen Fraktionen wurden in 6 verschiedenen Läufen Titerdifferenzen von 3,3 bis 6,8 erzielt (Tab. 2).

Fraktion (pI)	Titerunterschiede						Durchschnitt
5,41	4,8	5,3	6,4	5,8	6,4	4,3	5,5
6,61	6,4	3,5	5,8	6,4	5,7	5,5	5,6
7,29-7,46	--*	5,3	6,8	4,4	6,4	6,0	5,8
8,35	3,4	3,3	4,4	4,3	3,8	6,0	4,2

Tab.2:

Titerunterschiede zwischen homologen und heterologen Poolseren mit verschiedenen Sarcocystis muris-Antigenfraktionen im ELISA bei $E_{450} = 0,70$, 6 verschiedene Läufe

Fraktion 8,35: bei höchster Extinktion von S.dispersa

* Reagenzglas beim Beschallen zerbrochen

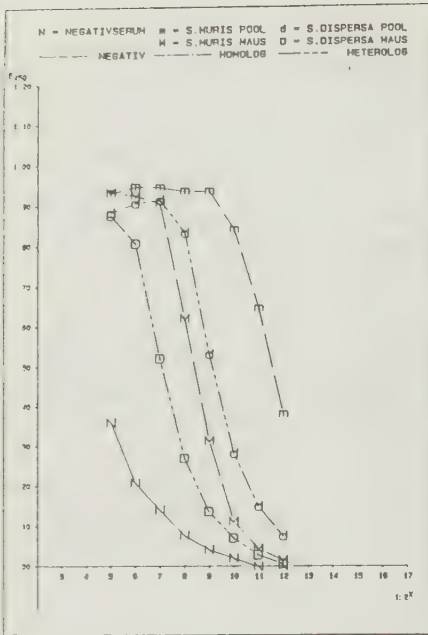


Abb.10: Pool- und Einzelseren experimentell infizierter Mäuse im ELISA mit unfractioniertem *Sarcocystis muris*-Antigen

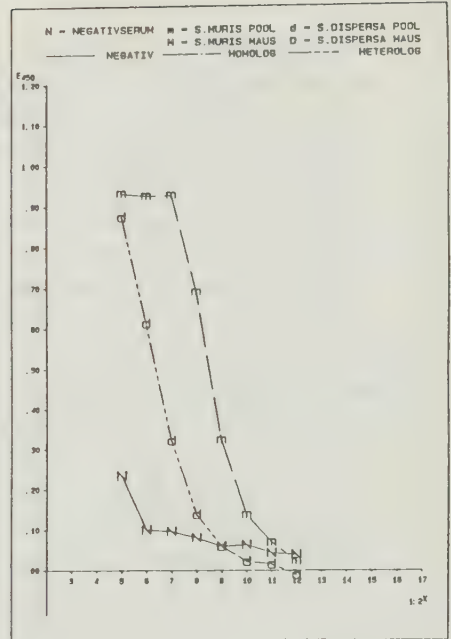


Abb.11: Pool- und Einzelseren experimentell infizierter Mäuse im ELISA mit Querschnitt von gesamtem fraktionierten *Sarcocystis muris*-Antigen

Für *S. dispersa* wählte ich pI 4,60, 5,30 und 6,24 und verfuhr mit diesen Fraktionen wie mit jenen von *S. muris*. Als sich in mehreren Versuchen damit keine Steigerung der Spezifität erzielen lassen, nahm ich nach und nach weitere Fraktionen hinzu. Zusammen führte ich 12 verschiedene Läufe durch und gewann dabei insgesamt 74 Fraktionen von 8 pI-Bereichen. Nicht fraktioniertes Antigen

und Gelquerschnitte mit dem gesamten fraktionierten Antigen brachten Titerunterschiede von 2,6 und 3,3 (Abb. 12). Im Vergleich dazu ließ sich mit den Fraktionen im Durchschnitt nicht nur keine Steigerung der Spezifität erzielen (Abb. 13), sondern die Ergebnisse lagen zum Teil sogar noch deutlich darunter (Tab. 3).

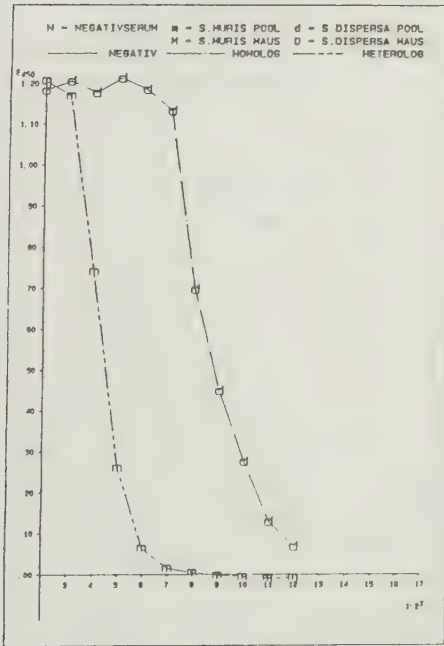


Abb. 12: Poolserum experimentell infizierter Mäuse im ELISA mit Querschnitt von gesamtem fraktioniertem *Sarcocystis dispersa*-Antigen

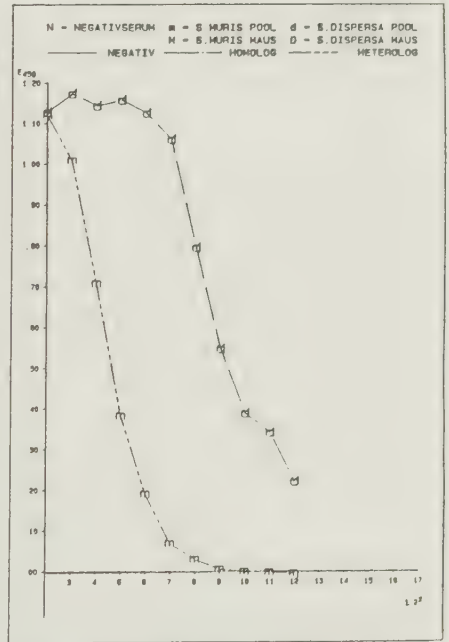


Abb. 13: Poolserum experimentell infizierter Mäuse im ELISA mit *Sarcocystis dispersa*-Antigenfraktion pI 4,85-5,10

Fraktion (pI)	4,20- 4,30	4,60	4,85- 5,10	5,30	5,45- 5,55	6,24	6,40	7,55
kleinste Titerdifferenz	2,1	1,2	2,1	1,7	1,1	0,3	0,1	-0,3
größte Titerdifferenz	2,9	3,7	4,4	3,5	3,0	4,5	0,3	2,0
Durchschnitt	2,7	2,7	2,8	2,6	2,5	2,0	1,4	0,43

Tab.3:

Titerunterschiede zwischen homologen und heterologen Poolseren mit verschiedenen *Sarcocystis dispersa*-Antigenfraktionen bei $E_{450} = 0,70$ im ELISA

IV.BESPRECHUNG DER ERGEBNISSE

Die Elektrofokussierung führte zu einer weitergehenden Auftrennung von Sarkosporidienantigenen, als die bisher in der Literatur dafür angeführten Methoden, SDS-Elektrophorese (O'DONOGHUE und WEYRETER, 1982; ABBAS und POWELL, 1983) und Säulenchromatographie (KLIMA, 1979; O'DONOGHUE und WEYRETER, 1982). Das Verfahren ermöglichte die Differenzierung von *S.muris* und *S.dispersa*-Antigen auf Grund ihrer Proteilmuster.

Die vielfach beschriebene enge Verwandtschaft unter den Sarkosporidien (Tab. 1) fand bei den Immunoblots in zahlreichen Übereinstimmungen der Muster ihren Ausdruck. Eine unterschiedlich stark ausgeprägte Speziespezifität der verschiedenen Fraktionen eines Antigenextraktes war im EIA mit homologem und heterologem Mäuseserum deutlich zu erkennen. Ausschließlich mit einem der beiden Pools deutlich reagierende Anteile ließen sich jedoch nicht feststellen. Mit dem heterologen Serum fehlende Banden lieferten auch mit dem homologen nur eine schwache Reaktion. Die im EIA sich ergebenden Bandenmuster wiesen jedoch hinreichende Unterschiede für eine Speziesdifferenzierung auf.

Gegen welche morphologischen Strukturen der einzelnen Entwicklungsstufen des Parasiten der Zwischenwirt Antikörper bildet, ist bisher ungeklärt. Die zahlreichen bekannten Kreuzreaktionen zwischen Stadien (Tab. 1) lassen den Schluß zu, daß während der Entwicklung von Sarkosporidien immer ähnliche Antigenstrukturen auftreten. Auch mit den hier verwendeten Methoden unterscheiden sich Zwischenwirtsserum und Anti-Zystozoiten-Serum in ihren

Ergebnissen nur wenig. Zwar waren mit Mäuseserum bei beiden Spezies einzelne Banden besser zu differenzieren, doch lagen auch mit HIS an diesen pI-Werten zumindest diffuse Reaktionen vor. Da ausschließlich mit HIS reagierende Fraktionen nicht auftraten, enthielten die Extrakte keine mit den in der Maus zu diesem Zeitpunkt zirkulierenden Antikörpern nicht reagierenden Antigene.

Es traten jedoch Unterschiede in der Intensität der Reaktionen von HIS und Zwischenwirts serum mit gleichen Antigenfraktionen auf. Diese könnten durch eine hinsichtlich Art und Menge von der Zystozoitenzusammensetzung abweichende Antigenexposition der Maus verursacht werden. Allerdings müssen diese Unterschiede nicht unbedingt ein Abbild der natürlichen Verhältnisse sein. Sie könnten auch das Ergebnis unterschiedlicher Immunantworten der Antikörperbildner oder einer nur artefiziellen Verschiebung der Antigenzusammensetzung durch Gewinnung, Extraktion, Dialyse u.s.w. sein. Andererseits könnten Verarbeitung der Zystozoiten, Fokussierung (Porengröße des Gels) und Blotting (Verlust von Proteinen) natürlicherweise vorhandene Unterschiede verringern.

Die gegen Sediment gebildeten Hochimmunseren lieferten mit fokussiertem Zystozoitenextrakt die gleichen Reaktionen wie jene, die gegen dieses Extraktantigen gerichtet waren. Auf Grund der Herstellungsweise des Extraktes ist in das Sediment vermutlich der Großteil der Membranbestandteile eingegangen, während der Überstand vorwiegend leicht lösliche Proteine des Zytoplasmas und der Organellen enthielt. Die Übereinstimmung der Ergebnisse beider HIS auf den Blots läßt sich wohl damit erklären, daß die im Überstand vorwiegend aufgetretenen Proteine teilweise

gebunden und ungelöst blieben und auch im Sediment repräsentiert waren. Andererseits dürften im Überstand auch Membranproteine enthalten gewesen sein, wie es bei den Untersuchungen von ABBAS und POWELL (1983) der Fall war. Die im EIA verwendeten HIS enthielten dadurch offenbar genügend Antikörper gegen die Extraktproteine, um damit letztlich eine gleich intensive Färbung hervorzurufen. Antikörper gegen andere Bestandteile des Sediments, die im entsprechenden HIS eventuell vorhanden waren, konnten mangels passender Antigene auf den Blots nicht nachgewiesen werden.

Die verwendeten Seren waren auf gleiche Titer im ELISA mit homologem, unfraktioniertem Antigen eingestellt (HIS 1:4096, Mäusepools 1:1024). Daß trotzdem die Reaktionen mit *S.dispersa*-Antigen im EIA deutlich schwächer ausfielen, als diejenigen mit einer nach Proteinbestimmung gleich großen Menge von *S.muris*, lag offenbar am Antigen. Die gleiche Tendenz zeigte sich mit der Eiweißfärbung. Ursächlich dafür könnte das unterschiedliche Verhalten der Zystozoen bei der Zerkleinerung sein.

Während die ca. $5 \times 15 \mu\text{m}$ großen Zoiten von *S.muris* bereits nach der Bearbeitung mit dem Glashomogenisator größtenteils zerstört waren und daher nur kurz ultrabeschallt werden mußten, überstanden die ca. $2 \times 7 \mu\text{m}$ großen *S.dispersa*-Zoiten das Homogenisieren wesentlich besser; es war deshalb zur restlosen Zerkleinerung eine intensive Ultraschallbehandlung nötig. Möglicherweise führte diese zur Ruptur von Eiweißketten, damit zu einer Verminderung der antigenen Bestandteile und zu einem gesteigerten Gehalt an kurzkettigen Peptiden im Extrakt.

In der Eiweißbestimmung nach LOWRY und Mitarb. (1951) gehen Peptide in die Messung ein. Auch der Coomassie-Farbstoff reagiert mit Peptiden, jedoch sind die entstehenden Komplexe so klein, daß sie in den folgenden Entfärbeschritten aus dem Gel gewaschen werden (WESTERMEIER, pers. Mitteilung). Es ist denkbar, daß die nach der Proteinbestimmung berechnete Auftragsmenge bei S.dispersa nur einen geringen Anteil an darstellbaren Komponenten enthielt. Wenn durch die Dialyse (Ausschlußgrenze des Schlauches: 8000-15000 Dalton) ein Teil der Proteinbruchstücke entfernt wurde, stieg dadurch der Anteil der größeren Moleküle und damit die Wirkung einer gleichen Probenmenge an.

Vermutlich haben diese Eigenheiten des S.dispersa-Extraktes bei den Intensitätsschwankungen der Banden ab pI 5,20 eine Rolle gespielt. Für eine Erklärung reichen sie alleine jedoch nicht aus, da die Lagerbedingungen und das Vorgehen bei der beschriebenen Überarbeitung, auch für S.muris, immer die gleichen waren; auch traten die Bandendefizite sogar innerhalb gleicher S.dispersa-Chargen auf. Die Extrakte beider Spezies wurden auch bei der Fokussierung, dem Blotting, der Färbung und im EIA gleich behandelt, ohne daß sich mit S.muris-Antigen jemals ähnliche Schwierigkeiten ergeben hätten.

Der Einsatz von S.dispersa-Fraktionen im ELISA erwies sich ebenfalls als problematisch. HOFER (1981) ermittelte im ELISA mit S.dispersa-Mäuseseren auf S.muris-Antigen einen Titerabfall um 2-3 Stufen gegenüber dem homologen System. Dieses Ergebnis ließ sich mit meinem unfraktionierten S.muris-Antigen bestätigen. Für S.muris-Serum mit S.dispersa-Antigen fand HOFER (1981) eine Titerdifferenz

von 3-5 Stufen, während sich mit meinem *S.dispersa*-Gesamtantigen in diesem Fall ein durchschnittlicher Abstand von nur 2,6 Stufen zeigte. HOFER (1981) hatte seine Zystozoitien durch 2-maliges Einfrieren und Wiederauftauen und Homogenisieren zerkleinert. Auch die von mir im ELISA eingesetzten isolierten *S.dispersa*-Fraktionen brachten in keinem Fall eine ausreichende Spezifitätssteigerung.

Im Gegensatz zu *S.dispersa* ließ sich durch Fraktionierung des *S.muris*-Antigens der Titerunterschied zwischen homologem und heterologem Poolserum vergrößern. Bei der Untersuchung unbekannter, homologer Seren mit sehr niedrigen Titern oder sehr hochtitriger heterologer Seren könnte möglicherweise trotz Verwendung solcher Fraktionen die Beurteilung schwierig sein. Durch vergleichenden Einsatz von Gesamtantigen und Fraktion wäre dies zu umgehen. Heterologes Serum kann dann durch die Abschwächung seiner Reaktion mit der Fraktion gegenüber jener mit dem unfraktionierten Antigen identifiziert werden.

V. ZUSAMMENFASSUNG

Die Möglichkeit der serologischen Differenzierung von *Sarcocystis muris*- und *S. dispersa*-Infektionen bei Mäusen mit Hilfe der isoelektrischen Fokussierung, des Electroblothing und des Enzyme Immuno Assay (EIA) wurde untersucht.

Als Antigene dienten Extrakte aus Zystozoiten (80.-90.Tag p.i.) der beiden Arten. Diese Auszüge waren in fokussierten Gelen auf Grund unterschiedlicher, sich mit der Proteinfärbung ergebender Muster differenzierbar.

Für das EIA wurden Seren experimentell infizierter Mäuse (82.-90.Tag p.i.) und in Kaninchen gegen beide Spezies erzeugte Hochimmunseren verwendet. Das Reaktionsbild der fokussierten Antigene mit homologen Seren unterschied sich von jenem mit heterologen Seren; damit war eine serodiagnostische Differenzierung beider *Sarcocystis*-Arten möglich.

Während durch den Einsatz isolierter *S. dispersa*-Antigenfraktionen sich die Spezifität im Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) nicht steigern ließ, war dies mit 4 unterschiedlichen *S. muris*-Fraktionen möglich; es waren die Titerdifferenz um durchschnittlich 3 Stufen vergrößert, beim heterologen Serum die Anfangsextinktionen niedriger und der Kurvenverlauf flacher.

MAREIS, A.:Species specific serodiagnosis of *Sarcocystis muris* and *S.dispersa* infections in mice by isoelectric focusing and immunoblotting

Summary

An investigation was made on the fitness of isoelectric focusing and immunoblotting for the serological differentiation between *Sarcocystis muris* and *S.dispersa* infections in mice.

As antigens have been used extracts of cystocoites recovered by trypsin digestion of experimentally infected mice. They revealed different patterns in electrofocused and subsequently stained polyacrylamide gels.

After being electrophoretically transferred to nitrocellulose, they were incubated with rabbit immune sera or pooled sera of infected mice in homologous and heterologous systems. Homologous sera were differentiated from the heterologous ones by their different reaction patterns. These became visible after incubation with horseradish-peroxidase labeled second antibodies and 4-chloro-1-naphtol as substrate.

The use of isolated fractions of *S.dispersa* did not improve the specificity of the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), whereas 4 *S.muris* fractions were much more specific than the whole extract. Employing the whole extract as antigen, the dilutions of the heterologous and the homologous sera of intermediate hosts were in the ratio of 1:5,65 at O.D.=0,70. With the fractions as antigens the average ratio was 1:48,5. Optical densities seen in the homologous system were never gained in the heterologous system, not even at the highest antibody concentrations. Furthermore the graphs of the heterologous serum declined less rapidly.

VI. LITERATURVERZEICHNIS

- 1) Abbas, M.K., E.C. Powell (1983): Identification of surface antigens of *Sarcocystis muris* (Coccidia). *J. Protozool.* 30, 356-361
- 2) Burnette, W. N. (1981): "Western Blotting": Electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Anal. Biochem.* 112, 195-203
- 3) Cerna, Z. (1976): Relationship of oocysts of *Isospora buteonis* from the barn-owl (*Tyto alba*) to muscle cysts of sarcosporidians from the house mouse (*Mus musculus*). *Fol. Parasitol.* 23, 285
- 4) Cerna, Z. (1977): Cycle de développement sarcosporidien d'une coccidie, chez la souris, après infestation des animaux par des oocystes-sporocystes isolés de l'intestin de la chouette effraie (*Tyto alba*). *Protistologica* XIII, 401-405
- 5) Cerna, Z., I. Kolarova (1978): Contribution to the serological diagnosis of sarcocystosis. *Fol. Parasitol.* 25, 289-292
- 6) Cerna, Z., M. Louckova, H. Nedvedova, J. Varva (1979): *Sarcocystis*-infection in rabbits: serological evidence and experimental transmission. *J. Protozool.* 26, Suppl. 40A

- 7) Cerva, L., Z. Cerna (1980): Preliminary report on the results of indirect haemagglutination reaction with *Sarcocystis dispersa* antigen.
J. Protozool. 27, 72A-73A
- 8) Cerva, L., Z. Cerna (1982): Indirect haemagglutination reaction with *Sarcocystis dispersa* antigen.
Fol. Parasitol. 29, 219-225
- 9) Dubey, J.P. (1981): Development of immunity to sarcocystosis in dairy goats.
Am. J. Vet. Res. 42, 800-804
- 10) Dubey, J.P. (1983): Immunity to sarcocystosis: modification of intestinal coccidiosis, and disappearance of sarcocysts in dairy goats.
Vet. Parasitol. 13, 23-34
- 11) Erber, M., O. Geisel (1979): Untersuchungen zur Klinik und Pathologie der *Sarcocystis suicanis*-Infektion beim Schwein.
Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. 92, 197-202
- 12) Gestrich, R., A.-O. Heydorn, N. Bayşu (1975): Beiträge zum Lebenszyklus der Sarkosporidien. VI. Untersuchungen zur Artendifferenzierung bei *Sarcocystis fusiformis* und *Sarcocystis tenella*.
Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. 88, 191-197 und 201-204
- 13) Gut, J., Z. Cerna (1980): Infection of one-day-old mice with *Sarcocystis dispersa*.
J. Protozool. 27, Suppl. 72A

- 14) Hancock, K., C. W. Tsang (1983): India ink staining of proteins on nitrocellulose paper.
Anal. Biochem. 133,157-162
- 15) Hofer, J. (1981): Untersuchungen über die Entwicklung von *Sarcocystis muris* und *Sarcocystis dispersa* in der Maus und über Reaktionen des Zwischenwirtes nach ein- und mehrmaligen experimentellen Infektionen.
Vet. med. Diss., München
- 16) Hughes, H. P. A., A. H. Balfour (1981): An investigation of the antigenic structure of *Toxoplasma gondii*.
Parasite Immunol. 3,235-248
- 17) Kepper, A. (1981): Untersuchungen über den Verlauf der Antikörpertiter bei ein- und mehrmals mit *Sarcocystis muris* inokulierten NMRI-Mäusen mit Hilfe des indirekten Immunfluoreszenzantikörpertests (IFAT).
Vet. med. Diss., Hannover
- 18) Klima, U. (1979): Versuche zum Nachweis von Sarkosporidien-Infektionen bei Haustieren mit dem Enzyme-Linked-Immunosorbent-Assay (ELISA).
Vet. med. Diss., München
- 19) Leier, H. (1982): Versuche zur Immunisierung von Mäusen gegen *Toxoplasma gondii*- und *Sarcocystis muris*-Infektionen. Vet. med. Diss., München
- 20) Lightowlers, M.W. (1979): *Sarcocystis* vaccination trial. Vaccination SPF lambs against experimental *Sarcocystis tenella* infection. Annual Report AMRC

- 21) Lowry, O. H., N.J. Rosebrough, A. L. Farr, R. J. Randall (1951): Proteinmeasurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193, 165-175
- 22) Mehlhorn, H., O. Heydorn, R. Gestrich (1975): Licht- und elektronenmikroskopische Untersuchung an Cysten von *Sarcocystis fusiformis* in der Muskulatur von Kälbern nach experimenteller Infektion mit Oocysten und Sporocysten der großen Form von *Isospora bigemina* des Hundes. 1. Zur Entstehung der Cyste und der Cystenwand. Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig. A232, 392-409
- 23) Nedjari, M.T. (1978): Immundiagnostischer Nachweis der *Sarcocystis bovicanis*-Infektion beim Rind mit der indirekten Fluoreszenz-Antikörper-Reaktion (IFAR) unter experimentellen und natürlichen Bedingungen. Vet. med. Diss., Humboldt-Universität Berlin
- 24) Neumayer, F. (1982): Versuche zum Nachweis der Sarkosporidiose des Schweines mit dem IHA, IFAT und dem ELISA. Vet. med. Diss., München
- 25) O'Donoghue, P.J., H. Weyreter (1982): Antigen-charakterisierung, Antikörperklassifizierung und Immunkomplexe bei *Sarcocystis*-Infektionen. 10. Tag. Dt. Ges. Parasitologie, 30.3. - 2.4.1982, Stuttgart-Hohenheim
- 26) O'Donoghue, P.J., H. Weyreter (1983): Detection of *Sarcocystis* antigens in the sera of experimentally-infected pigs and mice by an immuno-enzymatic assay. Vet. Parasitol. 12, 13-29

- 27) Pereira, L., M. Perez (1976): Relacion IFI-intensidad del parasitismo *Sarcocystis* spp.
Ier. Comp. Nac. parasit. 29. 9. - 2. 10. 1976, Granada
- 28) Reiter, I., G. Weiland, B. Roscher, J. Meyer, K. Frahm (1981): Versuche zum serologischen Nachweis der Sarkosporidiose an experimentell mit Sarkosporidien infizierten Rindern und Schafen.
Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. 94, 425-430
- 29) Righetti, P. G., A. B. B. Righetti (1975): High voltage analytical and preparative isoelectric focusing.
Isoelectric focusing, Butterworths, London
- 30) Roscher, B. (1980): Die Erarbeitung serologischer Verfahren (IFAT, IHA) zum Nachweis der *Sarcocystis*-Infektion beim Schaf. Vet. med. Diss., München
- 31) Ruiz, A., J. K. Frenkel (1976): Recognition of cyclic transmission of *Sarcocystis muris* by cats.
J. Inf. Dis. 133, 409-418
- 32) Schnieder, T., M. Rommel (1983): Ausbildung und Dauer der Immunität gegen *Sarcocystis miescheriana* im Schwein bei kontinuierlicher Verabreichung kleiner Mengen von Sporozysten.
Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. 96, 167-170
- 33) Schöllner, F. (1982): Mikromorphologische Untersuchungen der Schizogonie, Endodyogenie, Zystenwandentwicklung und Zystendegeneration bei *Sarcocystis dispersa* in der Maus. Vet. med. Diss., München

- 34) Tadros, W., W. Hazelhoff, J. J. Laarman (1979): The detection of circulating antibodies against *Sarcocystis* in human and bovine sera by the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) technique. *Acta Leidensia* 47, 53-63
- 35) Towbin, H., T. Staehelin, J. Gordon (1979): Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76, 4350-4354
- 36) Weiland, G., I. Reiter, J. Boch (1982): Möglichkeiten und Grenzen des serologischen Nachweises von Sarkosporidieninfektionen. *Berl. Münch. Tierärztl. Wschr.* 95, 387-392
- 37) Weyreter, H., P. J. O'Donoghue (1982): Untersuchungen zur Immunserodiagnose der *Sarcocystis*-Infektionen. I. Antikörperbildung bei Maus und Schwein. *Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig.* A253, 407-416
- 38) Weyreter, H., M. Weber (1982): Untersuchungen über die Dauer der Immunität bei der *Sarcocystis suicanis*-Infektion der Schweine. 10. Tag. Dt. Ges. Parasitologie, 30.3. - 2.4.1982 Stuttgart-Hohenheim
- 39) Zielasko, B., J. Petrich, G. Trautwein, M. Rommel (1981): Untersuchungen über pathologisch-anatomische Veränderungen und die Entwicklung der Immunität bei der *Sarcocystis suicanis*-Infektion. *Berl. Münch. Tierärztl. Wschr.* 94, 223-228.

Herrn Professor Dr. Dr. h.c. J. Boch gilt mein besonderer Dank für die Überlassung des Themas und des wertvollen Arbeitsplatzes.

Für ihre freundliche, jederzeit gewährte Gesprächsbereitschaft, ihre Anregungen und für die Überlassung des Infektionsmaterials danke ich herzlich Frau Dr. Reiter.

Herrn Ulrich Paul danke ich für seine tatkräftige Unterstützung am Computer.

Allen technischen Mitarbeitern im Hause danke ich für die erwiesenen Hilfestellungen.

Lebenslauf

Name: Armin Josef Mareis

Geboren am 20.2.1954 in Kaisheim, Kreis Donau-Ries

Eltern: Josef Mareis

Rosina Mareis, geb.Fackler

Schulen:

1960-1961 Volksschule in Blindheim

1961-1965 Volksschule in Dillingen/Donau

1965-1975 Gymnasium in Dillingen/Donau

15 Monate Wehrdienst

Studium:

1976-1981 Studium der Veterinärmedizin an der
Ludwig-Maximilians-Universität München

Berufstätigkeit:

1982-1983 Assistent bei Dr. Arui, Donaueschingen

Mai 1983 - August 1984 Anfertigung der Dissertation am
Institut für vergleichende Tropenmedizin und Parasito-
logie der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximi-
lians-Universität München

